

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 01 JUL 1999
WIPO PCT

EP99/3141

Bescheinigung

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der
Stärkesynthese beteiligt sind"

am 8. Mai 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 N, C 07 H und A 01 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 29. April 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Joost

Aktenzeichen: 198 20 608.9





Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der Stärkesyntthese beteiligt sind

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Enzym aus Weizen codieren, das an der Stärkesyntthese in Pflanzen beteiligt ist. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Isoamylase.

Weiterhin betrifft diese Erfindung Vektoren, Wirtszellen, sowie Pflanzenzellen und Pflanzen, die die erfndungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen enthalten.

Zerner werden Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen beschrieben, die aufgrund der Einführung von erfndungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen eine in ihren Eigenschaften veränderte Stärke synthetisieren.

Um Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser finanziellen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Leben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höherem Pflanzen ist. Hierbei ist Weizen eine der wichtigsten Kulturpflanzen, da ca. 20 % der Gesamtstärkeproduktion der Europäischen Gemeinschaft aus ihr gewonnen werden.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen

Grundbausteinen, den Glucosomolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten und deren Kettenlängen unterscheiden, die darüber hinaus derivatisiert, z.B. phosphoryliert sein können. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosomolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das Auftreten von zusätzlichen α -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande. In Weizen besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 11 bis 37 % aus Amylose-Stärke.

Um eine möglichst vielfältige Anwendung von geeigneten Stärken für unterschiedlichste industrielle Bedürfnisse zu ermöglichen, ist es wünschenswert, Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die in der Lage sind, modifizierte Stärken zu synthetisieren, die für verschiedene Verwendungszwecke besonders gut geeignet sind. Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht in züchterischen Maßnahmen. Die züchterische Einflußnahme erweist sich beim Weizen aufgrund seines polyploiden Charakters (tetra- und hexaploid) jedoch sehr schwer. Erst kürzlich gelang durch Kreuzung natürlich auftretender Mutanten die Herstellung eines "waxy" (Amylose-freien) Weizens (Nakamura et al., Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 253-259).

Eine Alternative zu züchterischen Verfahren besteht in der gezielten Modifikation stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Stärkesyntthese und/oder Stärkemodifikation beteiligten Enzyme sowie die Isolierung der diese Enzyme codierenden Nucleinsäuremoleküle.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen



wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthese in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärkespeichernden Geweben die Amyloplasten.

Für eine weitere gezielte Veränderung des Verzweigungsgrades von in Pflanzen synthetisierter Stärke mit Hilfe gentechnischer Verfahren ist es nach wie vor erforderlich, DNA-Sequenzen zu identifizieren, die Enzyme codieren, die am Stärkemetabolismus, insbesondere an der Einführung oder am Abbau von Verzweigungen innerhalb der Stärkemoleküle, beteiligt sind.

Neben den sog. Q-Enzymen, die Verzweigungen in Stärkemoleküle einführen, kommen in Pflanzen Enzyme vor, die Verzweigungen auflösen können. Diese Enzyme werden als Debranching-Enzyme bezeichnet und werden entsprechend ihrer Substratspezifität in drei Gruppen eingeteilt:

- (a) Die Pullulanasen, die neben Pullulan auch Amylopektin als Substrat nutzen, kommen in Mikroorganismen, z.B. *Klebsiella*, und in Pflanzen vor.

In Pflanzen werden diese Enzyme auch als R-Enzyme bezeichnet.

(b) Die Isoamylasen, die nicht Pullulan, wohl aber Glycogen und Amylopektin als Substrat nutzen, kommen ebenfalls in Mikroorganismen und Pflanzen vor. Isoamylasen wurden beispielsweise in Mais (Manners & Carbohydr. Res. 9 (1969), 107) und Kartoffel (Ishizaki et al., Agric. Biol. Chem. 47 (1983), 771-779) beschrieben.

c) Die Amylo-1,6-Glucosidasen sind in Säugern und Hefen beschrieben und nutzen Grenzdextrine als Substrat.

n Zuckerrüben konnte von Li et al. (Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284) eben fünf Endo-und zwei Exoamylasen nur ein Debranching-Enzym vom 100 kD und ein pH-Optimum von 5,5 aufweist, ist in den Chloroplasten lokalisiert. Auch für Spinat wurde ein Debranching-Enzym beschrieben, das Pullulan als Substrat verwendet. Sowohl das Debranching-Enzym aus Spinat als

auch das aus der Zuckerrübe besitzen bei der Reaktion mit Amylopektin als Substrat verglichen mit Pullulan als Substrat, eine 5-fach geringere Aktivität (Ludwig et al., Plant Physiol. 74 (1984), 856-861; Li et al., Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284).

Bei der landwirtschaftlich wichtigen stärkespeichernden Kulturpflanze Kartoffel wurde die Aktivität eines Debranching-Enzyms von Hobson et al. (J. Chem. Soc., (1951), 1451) untersucht. Es gelang der Nachweis, daß das

entsprechende Enzym im Gegensatz zum Q-Enzym keine kettenverlängernde Aktivität besitzt, sondern lediglich α -1,6-glycosidische Bindungen hydrolysiert. Das Enzym konnte jedoch bisher nicht genauer charakterisiert werden. Im Fall der Kartoffel wurden bereits Verfahren zur Reinigung des Debranching-Enzyms sowie partielle Peptidsequenzen des gereinigten Proteins vorgeschlagen (WO 95/04826). Für Spinat wurde inzwischen die Reinigung eines Debranching-Enzyms, sowie die Isolierung einer entsprechenden cDNA beschrieben (Renz et al., Plant Physiol. 108 (1995), 1342).

Für Mais wurde bisher in der Literatur lediglich die Existenz eines Debranching-

Enzyms beschrieben. Dieses wird aufgrund seiner Substratspezifität in die Gruppe der Isoamylasen eingeordnet (siehe z.B. Hannah et al., Scientia

Horticulturae 55 (1993), 177-197 oder Garwood (1984) in Starch Chemistry and Technology, Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Puschall, E.F. (eds.), Academic Press San Diego, New York, Boston, 25-86). Die entsprechende Mutante wird als *s(sugary)* bezeichnet. Das Gen des *sugary*-Locus wurde kürzlich cloniert (siehe James et al., Plant Cell 7 (1995), 417-429). Neben dem *sugary*-Locus ist bisher in Mais kein anderer Genlocus bekannt, der ein Protein mit Debranching-

Enzymaktivität codiert. Es gab bisher auch keinerlei Hinweise, daß andere Debranching-Enzymformen in Mais vorkommen. Will man transgene Maispflanzen herstellen, die keinerlei Debranching-Enzymaktivitäten mehr aufweisen, z.B. um eine Verlängerung des Verzweigungsgrades der

Amylopektinstärke zu erzielen, so ist es erforderlich, alle in Mais vorkommenden

Debranching-Enzymformen zu identifizieren und die entsprechenden Gene oder cDNA-Sequenzen zu isolieren.



Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die mit einem der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle hybridisieren.

5

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die eine Isoamylase aus Weizen codieren und deren Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den Nucleotidsequenzen der oben beschriebenen Moleküle abweicht.

10

Um weitere Möglichkeiten bereitzustellen, beliebige stärke-speichernde Pflanzen, vorzugsweise Getreide, insbesondere Weizen, dahingehend zu verändern, daß sie eine modifizierte Stärke synthetisieren, ist es erforderlich, jeweils DNA-Sequenzen zu identifizieren, die weitere Isoformen von Verzweigungsenzymen codieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde,

15

Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, die an der Stärkebiosynthese beteiligte Enzyme codieren und mit deren Hilfe es möglich ist, gentechnisch modifizierte Pflanzen herzustellen, die die Herstellung von in ihren chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften veränderten pflanzlichen Stärken ermöglichen.

20

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher Nucleinsäuremoleküle, die Proteine mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen, wobei derartige Moleküle vorzugsweise Proteine codieren, die im wesentlichen die unter Seq ID No. 3 angegebene Aminosäuresequenz umfassen. Insbesondere betrifft die Erfindung

Nucleinsäuremoleküle, die die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder einen Teil davon, bevorzugt Moleküle, die die in Seq ID No. 1 angegebene codierende Region sowie entsprechende (korrespondierende) Ribonucleotidsequenzen enthalten.

20 25 30

Besonders bevorzugt erfolgt eine "Hybridisierung", unter den folgenden Bedingungen:

Hybridisierungspuffer: 2 x SSC; 10 x Denhardt-Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA;

Verhältnis 1:1:1); 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na₂HPO₄; 250 µg/ml Heringssperma-DNA; 50 µg/ml tRNA, oder

0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA
7% SDS

Hybridisierungstemperatur T = 65 bis 68°C
Waschpuffer: 0,2 x SSC; 0,1% SDS

• • • • •

Waschtemperatur

T = 40 bis 68°C.

7

8

8

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfundungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell Isoamylasen aus jeder beliebigen Weizenpflanze codieren, die derartige Proteine exprimiert.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfundungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken von Weizen oder Weizenpflanzengewebe isoliert werden. Alternativ können sie durch gentechnische Methoden oder durch chemische Synthese hergestellt werden.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Anwendung der erfundungsgemäßen Moleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der eversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2. Aufl, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt.

Verstanden, die lang genug sind, um eines der beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck **Derivat** bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die diesebiologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Isoamylasen weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit,

spektroskopische Eigenschaften, Ladungseigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.



Bei dem durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Protein handelt es sich um eine Isoamylase aus Weizen. Diese Proteine weisen gewisse Homologiebereiche zu bisher bekannten Isoamylasen aus anderen Pflanzenarten auf.

Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen kann es sich um DNA-

Moleküle handeln, insbesondere um cDNA- oder genormische Moleküle. Ferner können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle RNA-Moleküle sein. Die

erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können z. B. aus natürlichen Quellen gewonnen sein, oder durch rekombinante Techniken oder synthetisch hergestellt sein.

Gegenstand der Erfindung sind auch Oligonukleotide, die spezifisch mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül hybridisieren. Derartige Oligonukleotide haben vorzugsweise eine Länge von mindestens 10, insbesondere von mindestens

15 und besonders bevorzugt von mindestens 50 Nukleotiden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie

spezifisch mit erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, d.h. nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß mit Nucleinsäuresequenzen, die andere Proteine, insbesondere andere Isoamylasen codieren. Die erfindungsgemäßen

Oligonukleotide können beispielsweise als Primer für eine PCR-Reaktion verwendet werden oder als Hybridisierungsprobe für die Isolierung verwandter Gene. Ebenso können sie Bestandteile von antisense-Konstrukten sein oder von DNA-Molekülen, die für geeignete Ribozyme codieren.

Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Genteknik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten. Derartige Vektoren sind zur Transformation pro- oder eukaryontischer, vorzugsweise pflanzlicher Zellen geeignet.



Vorzugsweise besonders bevorzugt erlauben sie die Integration der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, gegebenenfalls zusammen mit flankierenden regulatorischen Regionen, in das Genom der Pflanzenzelle. Beispiele hierfür sind binäre Vektoren, die bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer eingesetzt werden können.

Der Begriff "Vektor" bezeichnet im allgemeinen ein geeignetes, dem Fachmann bekanntes Hilfsmittel, das den gezielten Transfer eines ein- oder doppelsträngigen Nucleinsäuremoleküls in eine Wirtszelle ermöglicht, beispielsweise einen DNA- oder RNA-Virus, ein Virusfragment, ein Plasmidkonstrukt, das in An- oder Abwesenheit von regulatorischen Elementen zum Nucleinsäure-Transfer in Zellen geeignet sein kann, Trägermaterialien wie Glasfaser oder auch Metallpartikel wie sie z.B. beim "particle gun"-Verfahren eingesetzt werden können, er kann aber auch ein Nucleinsäuremolekül umfassen, das durch chemische oder physikalische Verfahren direkt in eine Zelle gebracht werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

Die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in prokaryontischen Zellen, beispielsweise in Escherichia coli, ist insofern interessant, als daß auf diese



weise eine genauere Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Enzyme, für die diese Moleküle codieren, ermöglicht wird. Es ist insbesondere möglich, dass ein Produkt, das von den entsprechenden Enzymen in Abwesenheit anderer, in der pflanzlichen Zelle an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme synthetisiert wird, zu charakterisieren. Dies lässt Rückschlüsse zu auf die Funktion, die das entsprechende Protein bei der Stärkesynthese in der Pflanzenzelle ausübt.

darüber hinaus ist es möglich, mittels gängiger molekulärbiologischer Techniken (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle einzuführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutationen möglich, bei denen durch fortschreitende Deletionsen vom 5'- oder vom 3'-Ende der dierenden DNA-Sequenz Nucleinsäuremoleküle erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionsen am Ende der Nucleotidsequenz ist es beispielweise möglich, Aminosäuresequenzen zu identifizieren, die für die Translokation des Enzyms in die Plastiden verantwortlich sind (Transpeptid). Dies erlaubt es, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Entfernen der entsprechenden Sequenzen nicht mehr in den Plastiden, sondern im Cytosol lokalisiert sind, oder aufgrund der Addition von anderen Signalsequenzen in anderen Kompartimenten lokalisiert sind.

ndererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, in denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluss beispielweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten K_m -Wert besitzen (er nicht mehr den normalenweise in der Zelle vorliegenden Regulationenmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen).

Des Weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat- oder Produktspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-Temperatur-Profil aufweisen.

5 Für die gentechnische Modifikation prokaryontischer Zellen können die erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring

10 Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptores oder Linker angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder 15 Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethode werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse oder weitere biochemisch-molekulärbiologische Methoden durchgeführt.

20 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere pro- oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen erfundungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfundungsgemäßen Vektor transformiert sind, sowie Zellen, die von derart transformierten Zellen abstammen und ein erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um pro- oder eukaryontische, insbesondere um pflanzliche Zellen.

Gegenstand der Erfindung sind ferner rekombinant herstellbare Proteine mit der Aktivität einer Isoamylase, die durch die erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle



codiert werden, sowie Verfahren zu deren Herstellung, worin eine erfundungsgemäße Wirtszelle unter dem Fachmann bekannten, geeigneten Bedingungen

kultiviert wird, die die Synthese des erfundungsgemäßen Proteins erlauben, und es anschließend aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

5

Durch die Bereitstellung der erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es nun möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von

Pflanzen gezielt einzugreifen und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur

Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die in ihren physikalisch-chemischen

Eigenschaften, beispielsweise dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, den Gel- oder Filmbildungseigenschaften, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu bekannter Stärke verändert ist.

5

Möglich ist somit die Expression der erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in

pflanzlichen Zellen, um die Aktivität der entsprechenden Isoamylase zu erhöhen, oder die Einführung in Zellen, die dieses Enzym natürlicherweise nicht exprimieren.

Ferner ist es möglich, die erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Methoden zu modifizieren, um erfundungsgemäße Isoamylasen zu erhalten, die nicht mehr den natürlichen zelleigenen

Regulationsmechanismen unterliegen; bzw. veränderte Temperatur-Aktivitätsprofile oder Substrat- bzw. Produktspezifitäten aufweisen.

5

Bei der Expression der erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die

Localisation in einem bestimmten Kompartiment zu erreichen, muß die Lokalisation in Plastiden gewährleistende Sequenz deletiert werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten.

Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

5

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem erfundungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder Vektor transformiert wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig transformierten Zellen abstammen. Derartige Zellen enthalten ein oder mehrere erfundungsgemäße Nucleinsäuremoleküle, wobei diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem geeigneten Promotor. Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im

Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genetischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfundungsgemäße transgene Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie eines erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die Zellen eingeführten Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfundungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden insbesondere dadurch unterscheiden, daß diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist(sind) an denen sie natürlicherweise nicht vorkommt(vorkommen). Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nach dem Fachmann bekannten Verfahren einfach überprüfen.

10

Ist das in das pflanzliche Genom eingeführte erfundungsgemäße

5

unterscheiden, daß diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist(sind) an denen sie natürlicherweise nicht vorkommt(vorkommen). Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nach dem Fachmann bekannten Verfahren einfach überprüfen.

10

Ist das in das pflanzliche Genom eingeführte erfundungsgemäße



Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, so weisen die ansgenen Pflanzenzellen Transkripte der erfindungsgemäß den achmann bekannten Verfahren einfach nachweisen lassen.

¹ das eingeführte erfindungsgemäß Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, können die erfindungsgemäß den Zellen von natürlicherweise auftretenden beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression

erfindungsgemäß Nucleinsäuremolekül unterscheiden werden. Die transgenen Pflanzenzellen enthalten vorzugsweise mehr Transkripte der erfindungsgemäß den Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. "Mehr" bedeutet dabei vorzugweise mindestens 10% mehr, bevorzugt mindestens 20% mehr und besonders bevorzugt mindestens 50% mehr Transkripte s entsprechende, nicht-transformierte Zellen. Vorzugweise weisen die Zellen mer eine entsprechende (mindestens 10%, 20% bzw. 50%ige) Aktivitätsteigerung ³ s erfindungsgemäß Proteins auf. Die transgenen Pflanzenzellen können nach ³ m Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden.

ie durch Regeneration der erfindungsgemäß transgenen Pflanzenzellen

nd Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die oben beschriebenen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um

lanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als ich dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, vorzugsweise ²⁵ Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, z.B. dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärke-³⁰ korngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Insbesondere kann eine solche Stärke im Hinblick auf die Viskosität und/oder die Film- oder Gelbildungseigenschaften von

e Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäß lanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge.



Stecklinge, Calli, Protoplasten, Zellkulturen etc..

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer oben beschriebenen erfindungsgemäß Pflanze und/oder aus stärkespeichernden Teilen einer solchen Pflanze.

Verfahren zur Extraktion der Stärke von Pflanzen oder von stärkespeichernden Teilen von Pflanzen, insbesondere aus Weizen, sind dem Fachmann bekannt, vgl. z.B. Eckhoff et al. (Cereal Chem. 73 (1996), 54-57) "Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468; Mais und Sorghum-Stärke; Herstellung" von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479; Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärke; Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490; Kartoffelstärke; Herstellung und Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506; Weizenstärke; Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528;

Reissstärke; Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtröckner und Wirbelschichttröckner.

Die erfindungsgemäß transgene Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren, aufgrund der Expression eines erfindungsgemäß Nucleinsäuremoleküls eine Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, z.B. dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, der Stärke-²⁵ korngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Insbesondere kann eine solche Stärke im Hinblick auf die Viskosität und/oder die Film- oder Gelbildungseigenschaften von

Kleistern dieser Stärke im Vergleich zu bekannten Stärken verändert sein.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, Pflanzen sowie deren Vermehrungsmaterial erhältlich ist und Stärke, die durch das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

Ferner ist es möglich, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle Pflanzenzellen und Pflanzen zu erzeugen, bei denen die Aktivität eines

erfindungsgemäßen Proteins verringert ist. Dies führt ebenfalls zur Synthese einer Stärke mit veränderten chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften verglichen mit Stärke aus Wildtyp-Pflanzenzellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein transgene Pflanzenzelle,

enthaltend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, in der die Aktivität einer Isoamylase im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen reduziert ist.

Die Herstellung von Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität einer Isoamylase kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden anti-sense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressionseffektes oder die

Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyme, das spezifisch Transkripte spaltet, die eine Isoamylase codieren, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Verfahren, vgl. Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol.

:5 Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159).

Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

i) Vorzugsweise wird zur Reduzierung der Aktivität einer erfindungsgemäßen Isoamylase in den pflanzlichen Zellen die Anzahl der sie codierenden Transkripte

reduziert, z.B. durch Expression einer antisense-RNA.

Hierzú kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein erfindungsgemäßes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Es können im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense-Inhibition insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 bp verwendet werden. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen, die kürzer als 2500 bp sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

20 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer erfindungsgemäßen Zelle oder Pflanze und/oder aus stärkespeichernden Teilen einer solchen Pflanze.

25 Gegenstand der Erfindung ist ferner Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Zellen, Pflanzen sowie Vermehrungsmaterial oder deren Teilen erhältlich ist sowie Stärke, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erhältlich ist.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für

verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Grundsätzlich lassen sich die Einsatzmöglichkeiten der erfüllungsgemäßen Stärken in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch z.B. geringerer Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die erfüllungsgemäßen Stärken wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

1. **Nahrungsmittelindustrie**
2. **Nicht-Nahrungsmittelindustrie**

In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappelindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

2.1 Papier- und Pappelindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden. Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißgrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindervermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfleß von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

2.2 Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung

15
5
10
20
25
30

Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier-/Taufestigkeit, die Viskositätsstabilität in Salzlösungen, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit



als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuungsteim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

10 2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärke als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichthilfsmittel, d.h. als Hilfsmittel zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufrauung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgärne.

2.4 Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischt Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeladen werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

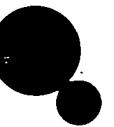
5 5. Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuungsteim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

10 2.6 Einsatz in Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt in der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

20 2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tablettensprengmittel dienen, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.



2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. briekettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich verminderd werden kann.

2.9 Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel- versetzten Säuden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellsstärken, versetzt ist.

Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindfestigkeit. Darüber hinaus können die Quellsstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen

gummiereten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozeß (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

15

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist

die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyethylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyethylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in

Polyethylenolein kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, eine verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wählriegen Farben erreicht werden.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit



der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten:

- eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme,
- Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrüstdicke, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderde Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

0

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch

- feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des Weiteren sind Stärke/Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen

- Wasserbindungsvermögen Stärkepropolymerate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgeprägten Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepropolymerate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpflanzungen.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30

Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten,

- Dicksungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taufestigkeit, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind

- zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt,

Zur Expression der erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen



dertartig modifizierten Pflanzen.

RNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen erwähleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Innovalle Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der 'atatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine Pollenspezifische Expression in oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder Tomotoren von Zein-Genen aus Mais.

erner kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte eigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gleilen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung, die ein Protein mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen codieren. Die Errungungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle erlauben die Herstellung dieses Enzyms, dessen funktionale Identifizierung innerhalb der Stärkebiosynthese, die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen, bei denen die Aktivität dieses Enzyms verändert ist und ermöglicht somit die Synthese einer Stärke mit veränderter Struktur und veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften in



Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell auch dazu verwendet werden, Pflanzen herzustellen, in denen die Aktivität der

erfindungsgemäßen Isoamylase erhöht oder verringert ist und gleichzeitig die Aktivitäten anderer, an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme verändert sind. Durch die Veränderung der Aktivitäten einer Isoamylase in Pflanzen kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke. Ferner können Nucleinsäuremoleküle, die eine Isoamylase codieren oder entsprechende antisense-Konstrukte, in Pflanzenzellen eingebracht werden, bei denen bereits die Synthese endogener Stärkesynthasen oder von Verzweigungsenzymen inhibiert ist (wie z.B. in WO 92/14827 oder Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch:Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition, 25-86).

15

Soll die Inhibition der Synthese mehrerer an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme in transformierten Pflanzen erreicht werden, so können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Enzyme codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promoters enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden bzw. unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors stehen. Letztere Alternative wird in der Regel

vorzuziehen sein, da in diesem Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert werden sollte. Für die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es nicht. Das

entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 10 kb, vorzugsweise

von 5 kb nicht überschreiten.



Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw.. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E.coli*-Zellen

5 werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wieder gewonnen. Als Analysemethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelektrophorese und weitere biochemisch-molekularebiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und

10 gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden cloniert werden.

Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

5 Weiterhin können die Konstrukte in pflanzliche Mutanten eingebracht werden, die für ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defekt sind (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall: Starch:Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können sich auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthetasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (BE I und II), "Debranching"-Enzyme, Disproportionierungsenzyme und Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung.

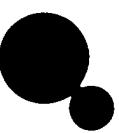
10 Mit Hilfe einer derartigen Vorgehensweise ist es weiterhin möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

15 Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

20 Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist in der Regel die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

25 Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid

30



DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

erden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende NA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren innen aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, sich homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien tegniert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA zwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helperplasmids kann der intermediäre Vektor auf

Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren innen sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein elektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und

linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 31-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-

egion trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium läßt sich zur Transformation von Pflanzenzellen anwenden.

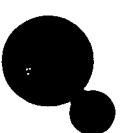
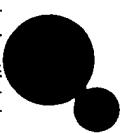
Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdruckerei Kanters B.V., Alblaserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Brit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben

orden.
Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate weckmäßigweise mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium lizogenes kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensionsultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches

Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch

5 Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Städler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

- 10 Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels Agrobacterium basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282).
- 15 Alternative Verfahren zur Transformation von monokotylen Pflanzen bestehen mittels des biolistischen Ansatzes, der Protoplastentransformation oder der physikalisch oder chemisch induzierten DNA-Aufnahme in Protoplasten, z.B. durch Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, Transfer von DNA mittels Glasfasern, Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion von DNA in Mikrospermen oder Pro-Embryonen, die DNA-Aufnahme durch keimenden Pollen und die DNA-Aufnahme in Embryonen durch Quellung (zur Übersicht: Polnykus, Physiol. Plant (1990), 269 – 273).
- 20 Drei der oben genannten Transformationssysteme konnten in der Vergangenheit für verschiedene Getreide etabliert werden: die Elektroporation von Gewebe, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikel-Beschuß in regenerierbare Gewebe und Zellen (zur Übersicht: Jähne et al., Euphytica 85 (1995), 35 – 44).
- 25



Die Transformation von Weizen wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (zur Übersicht: Maheshwari et al., Critical Reviews in Plant Science 14 (2) (1995), 149 bis 178); Hess et al. (Plant Sci. 72 (1990), 233) benutzten das Verfahren der Makroinjektion, um Pollen und Agrobakterien in unmittelbare Nähe zu bringen. Die Mobilisierung des Plasmids, daß das *nptII* Gen als selektierbaren Marker enthielt, wurde mittels Southern Blot Analyse und NPTII Test nachgewiesen. Die Transformanten zeigten einen normalen Phänotyp und waren fertil. Die Kanamycin-Resistenz konnte in zwei aufeinanderfolgende Generationen nachgewiesen werden. Die erste transgene, fertile Weizenpflanze, die nach Beschuß mit Mikroprojektilen gebündelter DNA regeneriert werden konnte, wurde von Vasil et al. (BioTechnology 10 (1992), 667 – 674) beschrieben. Das Zielgewebe für den Beschuß war eine embryogene Kalluskultur (Typ C Kallus). Als Selektionsmarker wurde das bar Gen eingesetzt, das eine Phosphinothricin Acetyltransferase codiert und somit eine Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin vermittelt. Ein weiteres System wurde von Weeks et al. (Plant Physiol. 102 (1993), 1077 – 1084), sowie Becker et al. (Plant J. 5(2) (1994), 299 – 307) beschrieben. Hier ist das Zielgewebe für die DNA-Transformation das Skutellum unreifer Embryonen, das in einer einleitenden *in vitro* Phase zur Induktion somatischer Embryonen angeregt wurde. Die Effizienz der Transformation liegt bei dem von Becker et al. (loc cit.) entwickelten System mit 1 transgene Pflanze pro 83 Embryonen der Sorte "Florida" deutlich höher als bei dem von Weeks et al. etablierten System mit 1 bis 2 transgenen Pflanzen pro 1000 Embryonen der Sorte "Bohwhite".

Das von Becker et al. (loc. Cit) entwickelte System bildet die Basis für die in den Beispielen beschriebenen Transformations-experimente.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid wie Phosphinothricin oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin oder

5 Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen werden. Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

10 15 Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung illustrierten und stellen keinerlei Beschränkung dar.

1. Clonierungsverfahren

20 Zur Clonierung in *E. coli* wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

25 2. Bakterienstämme

Für den Bluescript-Vektor und für die antisense-Konstrukte wurde der *E. coli* Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) verwendet. Für die *in vivo* Excision wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet.



Transformation unreifer Weizenembryonen
werden mit der dem Medium zugewandten Embryoachse auf Induktionsmedium

Medien

MS:	100 ml/l Makrosalz 1 ml/l Mikrosalz 2 ml/l Fe/NaEDTA 30 g/l Saccharose	(D. Becker und H. LÖRZ, Plant Tissue Culture Manual (1996), B 12:1-20)
30:	MS + 2,4-D (2 mg/l)	
31:	MS + 2,4-D (2 mg/l) + Phosphinothricin (PPT, aktive Komponente des Herbizids BASTA (2 mg/l))	
32:	MS + 2,4-D (0,1 mg/l) + PPT (2 mg/l)	
39:	MS + 2,4-D (2 mg/ml) + je 0,5 N Mannit/Sorbit	
3:	je angegebenen Medien wurden auf den pH-Wert 5,6 mit KOH eingestellt und mit 3 % Gelrite verfestigt.	
15:	Die Markierung von DNA-Fragmenten, die als Screeningsonden eingesetzt wurden, erfolgte über eine spezifische PCR unter Einbau von DIG-markiertem dUTP (Boehringer Mannheim, Deutschland).	
20:	In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:	
	20 x SSC	175,3 g NaCl 88,2 g Natrium-Citrat ad 1000 ml mit ddH ₂ O pH 7,0 mit 10 N NaOH
	Beispiel 1:	Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine Isoamylase (sugary-homolog) aus Weizen (<i>Triticum aestivum</i> <i>L.</i> , cv Floridal) codiert
	14:	Transformation werden Ähren mit Karyopsen der Entwicklungsstufe 12 bis 14



Tage nach Anthesis geerntet und oberflächensterilisiert. Die isolierten Skutellä
werden mit der dem Medium zugewandten Embryoachse auf Induktionsmedium
30 plattiert.

5:	Nach 2 bis 4 tägiger Vorkultur (26°C, dunkel) werden die Explantate auf Medium # 39 zur osmotischen Vorkultur (2 bis 4 h, 26°C, dunkel) umgesetzt.
10:	Zur biolistischen Transformation werden pro Schuß ca. 29 µg Goldpartikel, auf die zuvor wenige µg der Ziel-DNA gefällt wurde, eingesetzt. Da es sich bei den durchgeföhrten Experimenten um Co-Transformanten handelt, wird die Ziel-DNA in einem Verhältnis von 1:1, bestehend aus dem Zielgen und einem Resistenzmarkergen (bar-Gen) dem Fällungsansatz zugegeben.

10:	DIG-Markierung von DNA-Fragmenten
15:	Die Markierung von DNA-Fragmenten, die als Screeningsonden eingesetzt wurden, erfolgte über eine spezifische PCR unter Einbau von DIG-markiertem dUTP (Boehringer Mannheim, Deutschland).

20:	In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:
	20 x SSC
	175,3 g NaCl
	88,2 g Natrium-Citrat
	ad 1000 ml mit ddH ₂ O
	pH 7,0 mit 10 N NaOH
	Beispiel 1: Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine Isoamylase (sugary-homolog) aus Weizen (<i>Triticum aestivum</i> <i>L.</i> , cv Floridal) codiert
	14:
	Transformation werden Ähren mit Karyopsen der Entwicklungsstufe 12 bis 14

14:	Transformation werden Ähren mit Karyopsen der Entwicklungsstufe 12 bis 14
1:	Die Methode zur Transformation unreifer Embryonen aus Weizen wurde von Becker und LÖRZ (D. Becker und H. LÖRZ, Plant Tissue Culture Manual (1996), B12: 1 bis 20) entwickelt und optimiert.
	den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde sich an das von Becker und LÖRZ (loc. Cit.) ausgearbeitete Protokoll gehalten.

14 Transformation werden Ähren mit Karyopsen der Entwicklungsstufe 12 bis 14

Zur Identifizierung einer cDNA, die eine Isoform einer Isoamylase (sugary) aus Weizen codiert, wurde die Strategie des heterologen Screening verfolgt. Hierfür wurde eine cDNA-Bank aus Weizen mit einer sugary-Sonde aus Mais durchmusterter.

5

Die Isolierung der Sonde (sugary-Sonde) aus einer Mais cDNA Bank erfolgte mittels spezifischer Primer durch PCR-Amplifikation. Die Clonierung der Mais

cDNA Bank erfolgte aus poly(A) + RNA aus einem Gemisch gleicher Anteile

13,17,19,20,22,25 und 28 Tage (DAP) alter Karyopsen in einem Lambda Zap II

10 Vektor analog den Angaben des Herstellers (Lambda ZAP II-cDNA Synthesis Kit Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland). Bei allen verwendeten Karyopsen,

außer bei den 13 Tage alten Körnern, war vor der RNA-Isolierung der Embryo entfernt worden.

15 Die Amplifizierung des DNA-Fragments, das als Sonde zur Durchmusterung der

Weizen cDNA Bank eingesetzt wurde, erfolgte mit den folgenden Primern:

su1p-1a: 5' AAAGGCCAATATTACCTTTAGG 3' (Seq.ID No. 4)

su1p-2: 5' GCCATTTCAACCGTCTGAAGTCGGGAAGTC 3' (Seq.ID No. 5)

20 Als Template für die PCR-Reaktion wurden 2 µl der amplifizierten Mais cDNA

Bank eingesetzt. Die PCR-Reaktion enthielt des weiteren 1,5-3mM MgCl₂, 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 0,8mM dNTP Mix, 1µM Primer su1p-1a, 1µM Primer su1p-2 und 2,5 Units Taq Polymerase (rekombinant, Life Technologies).

Die Amplifizierung wurde mit einem Triblock der Firma Biometra nach dem

25 Schema: 4' (min)/ 95°C; 1' / 95°C; 45' (sek)/ 58°C; 1' 15' / 72°C; 30 Cycles

5' / 72°C. Die amplifizierte DNA Bande von ca. 990 bp wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Von diesem Fragment wurde nach dem gleichen Schema wie oben beschrieben eine zweite Amplifizierung durchgeführt. Das aus dieser zweiten Amplifizierung erhaltenen 990 bp Fragment

30 wurde mit dem Restriktionsenzym *BAM* HI in ein 220 bp und ein 770 bp Fragment zerschnitten. Nach nochmaliger Auf trennung des sugary-Fragments in

einem Agarosegel, Ausschneiden der Bande und Isolierung des Fragmentes erfolgte die DIG-Markierung der Sonde. Zur 'random prime' Markierung mit Digoxigenin wurden 500 ng sugary Fragment eingesetzt. Zu dem zu markierenden Fragment wurden 10 µl Random Primer gegeben und die Reaktion

5 wurde 5' bei 95-100°C erhitzt. Nach dem Erwärmen wurden 0,1mM dATP, 0,1mM dGTP, 0,1mM dCTP und 0,065mM dTTP und 0,035 mM Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim), sowie Klenow Puffer (Standard) und 1 Unit Klenow Polymerase zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT (Raumtemperatur) über Nacht durchgeführt. Zur Kontrolle der Markierung wurde ein Dot-Test

10 analog den Angaben des Herstellers ('The DIG System User's Guide for Filter Hybridization' der Firma Boehringer, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die Synthese der Weizen cDNA Bank erfolgte aus poly(A) + RNA von ca.21 Tage ('starchy'-Endosperm) alten Karyopsen in einen Lambda Zap II Vektor entsprechend den Angaben des Herstellers (Lambda ZAP II-cDNA Synthesis Kit Stratagene GmbH, Heidelberg). Nach Titerbestimmung der cDNA-Bank konnte ein Primärtiter von $1,26 \times 10^6$ pfu/ml ermittelt werden.

Zum Durchmuster der Weizen cDNA Bank wurden ca. 350.000 Phagen ausplattiert. Ausplattieren der Phagen und Abziehen der Platten erfolgte nach Standardprotokollen. Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Filter wurde in 5X SSC, 3% Blocking (Boehringer, Mannheim), 0,2% SDS, 0,1% Natrium Laurylsarcosin und 50 µg/ml Herringssperma DNA bei 55°C durchgeführt. Der

20 Hybridisierungslösung wurde 1ng/ml der markierten sugary Sonde zugesetzt und die Hybridisierung über Nacht inkubiert. Gewaschen wurden die Filter für 2X5' in 2X SSC, 1% SDS bei RT; 2X 10' in 1X SSC, 0,5% SDS bei 55°C; 2x 10' in 0,5X SSC, 0,2% SDS bei 55°C. Positive Clone wurden durch 2 weitere Screening Runden vereinzelt. Über *in vivo* Excision wurden vereinzelte Clone als Bluescript SK Phagemide erhalten (Durchführung analog den Angaben des

30 Herstellers; Stratagene, Heidelberg, Deutschland).



Nach Analyse der Clone über Minipräparierung und Restringierung der Plasmid-DNA wurde der Klon *Tasu-19* weiter analysiert.

Beispiel 2: Sequenzanalyse der cDNA-Insertionen des Plasmids pTaBE2

Aus dem Klon *Tasu-19* wurde die Plasmid-DNA isoliert und die Sequenz der cDNA-Insertionen mittels der Didesoxynukleotidmethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467) bestimmt.

Die Insertion des Klons *Tasu-19* ist 2997 bp lang und stellt eine partielle cDNA dar. Die Nucleotidsequenz ist unter Seq ID No. 1 angegeben.

Eine Vergleich mit bereits publizierten Sequenzen zeigt, daß die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz neu ist und eine codierende Region umfaßt, die Homologien zu Isoamylasen aus anderen Organismen aufweist.

Die Analyse der Sequenz zeigt auch, daß sich in der cDNA Sequenz zwei Introns in den Positionen 296-396 (Intron 1) und 1617-2144 (Intron 2) befinden.

Werden diese Introns entfernt, läßt sich eine Proteinsequenz ableiten, die Homologien zu den Proteinsequenzen von Isoamylasen anderer Organismen aufweist. Die zu den codierenden Bereichen der Seq ID No. 1 korrespondierende Aminosäure-Sequenz ist unter Seq ID No. 3 dargestellt.

Beispiel 3 Herstellung des Pflanzentransformationsvektors pTa-alpha-su 19

Für die Expression einer antisense-RNA zu der isolierten cDNA aus Weizen wurden auf der Grundlage des Basisplasmids pUC19 der Pflanzentransformationsvektor pTa-alpha-su19 konstruiert, indem die cDNA-Insertion des Plasmids pTa-alpha-su19 in antisense-Orientierung mit dem 3'-Ende des Ubiquitin-Promoters verbunden wurden. Dieser Promotor besteht aus dem ersten untranslatierten Exon und dem ersten Intron des *ubiquitin 1* Gens aus Mais



(Christensen A.H. et al., Plant Molecular Biology 18 (1992), 675-689). Teile des Polylinkers und der NOS-Terminator stammen aus dem Plasmid pAct1.cas (CAMBIA, TG 0063; Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australia). Vektorkonstrukte mit diesem Terminator und Konstrukten, die auf pAct1.cas basieren, sind in McElroy et al. (Molecular Breeding 1 (1995), 27-37) beschrieben. Der so entstandene Vektor wird pUb1.cas genannt.

Die Klonierung des Vektors erfolgt durch Restriktion eines 2kb Fragmentes aus dem Klon *Tasu19* mit dem Restriktionsenzym *Xba*I. Das Fragment wurde an den Enden mittels einer Klenow Reaktion aufgefüllt und anschließend in die *Sma* I Klonierungsstelle des Expressionsvektors pUb1.cas ligiert.

Der entstandene Expressionsvektor wird als Ta-alpha-su 19 bezeichnet und wird wie oben beschrieben zur Transformation von Weizen verwendet.

66-90-01

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 1 (cDNA aus 2997b mit 2 Introns):

5	TGGCGGAGGT	CTGGCGACGT	GCGGACCAA	TGGCAGGGG	GGAAAGGGG	60	AGTGTGGCA	ATACTTGAA	ATAGTTGAG	TGAATGTCAC	CTGGATTIT	TATATAACC	1680
5	AGGACGAGCC	GGTGGCGAG	GACAGGTAAG	CGCTGGGG	CGCTGCAAG	GGGGGGAGG	ACATGATGAT	ACACATCTAA	ATATAAACA	ATCATAGTGT	ATGCATATGC	ATTGGCTAA	1740
10	GAATGCCGG	GGCGCTGGC	GCCACCGCC	TGGCGGGG	GSTCAATTIC	GGCGCTATT	GAAGTATAG	TGTATACACT	AGTGTATAT	ATAGTTTAA	ACACCAACT	TGCCATGAA	1800
10	CGGGGGAGC	CACGCCCGG	GGCTCTCCC	TCTTCAGCC	AGAAGATCTC	AAGGGGTGG	GAACACATAG	GTTTCTACT	TACCTATT	ATTGCTCCG	TGATAATTC	ACTGAJAAAT	1860
15	TGCAATTAA	GTGTTGACT	GGGGCAATG	CTGAGGATA	GGGTGACCA	GGAGGTTCCC	CTTGAGCCC	TGAGTAGAGT	TCTTCAGCA	GGCGCCTT	TTTTGGCC	300	
20	CACNAATGC	TTTACGGGTA	CAGGTCAC	GGCACCTTG	CTCTCACTC	GGGGCACTAC	CTTGATGTT	CCATAGTGT	GGTGGATCT	TATGCTAAG	AGGAGCTG	420	
25	CTTGATGTT	CCATAGTGT	GGTGGATCT	TATGCTAAG	CAGTGATAG	GGGAGGGAG	TATGCTAAG	CTTGAGCTC	AGTGTGAC	GGGGCTTCCC	CCCCAAAG	480	
30	TATGTTGTC	CAGGCGCTG	TAACATTC	TGGCTCAGA	TGGCTGGCAT	GATCCCTCTT	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	GGTGTGAC	TTTCTCTTAA	AGGAGCTG	540	
35	CCATAGTCA	CGTTGATG	GGAGGGAC	CTACCTCTAA	GATATCTCA	AAAGGGCTG	CTTGAGCTA	CTTGAGCTC	TGCAACTCT	TATGTTGTA	AGATGAATG	600	
40	TGATGTTAT	AGATGCACT	GGGTGATTC	ACGAAGCATG	ATTCAAGCA	TETAGACAT	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	ATGATGGATT	TACACTGGCT	2100	
45	CTTGAGCTT	TCATGGAGC	TGTGTGAG	CTGACTATT	TGAAGGAGT	GGGAGGCTG	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGCAACTCT	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2160	
50	TGATGTTAT	TAATGCCCTG	CCATGAGTC	AACGAAGCTG	AGTACTCAC	CTCTTCTCC	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	ATGATGGATT	TACACTGGCT	2220	
55	AAGATGAACT	TTGGGGATA	TTCTACCAT	AACTCTTT	CACCAATGAC	AAGATACACA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2280	
60	TCAGGGGGA	TAAGAACCT	TGGGCGTGT	GGCATAAATG	AGTTCAAAAC	TTTGTGAGA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2340	
65	GAGGCTCACA	AACGGGAAAT	TGAGGTGATC	CTGGATGTTG	TCTTCACCA	TACAGTGAG	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2400	
70	GGTAAATGAGA	ATGGTCCAAAT	ATTATCATT	AGGGGTGCG	ATAATACTAC	ATRACTATG	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2460	
75	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2520	
80	CATCTCTGTC	TTGGCTAACT	CATGTAGAT	TGTTAGAT	ACTGGGTGAC	GGAAATGCT	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2580	
85	GGTAAATGAGA	ATGGTCCAAAT	ATTATCATT	AGGGGTGCG	ATAATACTAC	ATRACTATG	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2640	
90	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2700	
95	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2760	
100	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2820	
105	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2880	
110	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	2940	
115	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	3000	
120	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	3060	
125	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	3120	
130	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	3180	
135	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	3240	
140	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	3300	
145	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	3360	
150	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	3420	
155	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	3480	
160	CTTGACACCA	AGGGAGACTT	TTATACTAT	TCTGGCTG	GGAAATACCTT	CTACGTAA	CTTGAGCTT	CTTGAGCTC	TGATGTCAC	TATGTTGTA	AGAAGGAAAC	3540	

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 3 (Aminosäuresequenz aus 764 Aminosäuren):

50	SGPAPRLRRW	RPNATAGKGV	GEVCAAVVEA	ATKVEDEGEE	DEPVADRYA	LGGACBYLAG	1680
55	NPAPLGATAL	AGGVNFAVVS	GGATAAALCL	FTEPDVKDR	VTEEVPLDPL	MNRTGIVWWV	1740

FIEGELHNML YGYRFOGTF A PHCGHKLDS NWVWDPYAKA VSRGEYGV P ARGNNNCWPOM 180

AGMIPLPYST FDWEGDPLR YPQKDVLVYE MHLRGFTKHD SSNEHPGTF IGAWSKLDYL 240

KELGVNCIEL MPCHEFHELE YSTSSKMN F WGYSTINFFS PMTRYTSGGI KNCGRDAINE 300

FKTIVREAHK RGEVILDVV FNHTAEGNEN GPILSKKGVD NTYVMLAPK GEFYNYSGCG 360

NTFNCNHPV ROFIWCLRY WTEMHVGDF RFDLASMTR GSSLWDPVN V GAPIEGOMI 420

TTGTPLVTPP LIOMISNDPI LGGVVLAEA WDAGGLYAVG QPHWNWSE WNGKYRDIVR 480

QFIKGTDGFA GGFACLGGS PHLYCAGGRK PWHSINFVCA HDGFTLADLV TYNKKYNLPN 540

GGNNNNTYCH DSYVNVYFRWD KKEQYSLELR FCGLMTKFRK ECEGLGLEDF PTAKRLQWHG 600

HQPGKPDWSE NSRFVAFSMK DERQEIMVA FNTSHLPAW ELPERAGRWW ERVWDTGKPA 720

PYDFLTDDLP DRALTHQFS HFLYNSLYPM LSYSSVILV L RDV 764

Die Aminosäuresequenz ist mittels Einbuchstaben-Code für Aminosäuren dargestellt (vgl. z.B. Stryer, Biochemie, 1990, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, ISBN 3-89330-690-0).

15

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:
AAAGGCCCAA TATTATCCTT TAGG 24

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GCCATTTCAA CGGTTCTGAA GTCGGGAGT C 31

Patentansprüche:

AGR 98M 206

1. Nucleinsäuremolekül, codierend ein Protein mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

(a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID NO. 3 angegebene Aminosäuresequenz umfasst,

(b) Nucleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz oder Teile davon umfassen oder eine korrespondierende Ribonucleotidsequenz;

(c) Nucleinsäuremoleküle, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nucleotidsequenzen hybridisieren oder komplementär sind, und

(d) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht.

15

2. Nucleinsäuremoleküle nach Anspruch 1, das ein DNA-Molekül ist.

3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, das ein cDNA-Molekül ist.

20 4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein RNA-Molekül ist.

5. Nucleinsäuremolekül, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert.

25 6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, das ein Oligonucleotid mit einer Länge von mindestens 15 Nucleotide ist.

7. Vektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4.

30

47

27. Verwendung der Stärke nach Anspruch 18 oder 26 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, vorzugsweise von Back- oder Teigwaren.

28. Verwendung der Stärke nach Anspruch 18 oder 26 zur Herstellung von Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.

48

Zusammenfassung

AGR 98/M 206
27. Verwendung der Stärke nach Anspruch 18 oder 26 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, vorzugsweise von Back- oder Teigwaren.

Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der Stärkesynthese beteiligt sind

5

Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die Enzyme codieren, die an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Isoamylasen aus Weizen.

10

Weiterhin betrifft die Erfindung Vektoren und Wirtszellen, die die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle enthalten, insbesondere transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen, die eine gesteigerte oder verringerte Aktivität der erfundungsgemäßen Isoamylasen aufweisen.